МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
(УНУС)

Факультет агрономії
Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Допущено до захисту

«____» _____ 2023 р.

Зав. кафедри, д. с.-г. н., професор

_____ Людмила РЯБОВОЛ

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

КАЛЮСОГЕНЕЗ *IN VITRO* РИЖІЮ ЯРОГО В НАВЧАЛЬНО-НАУКОВІЙ ЛАБОРАТОРІЇ «БІОТЕХНОЛОГІЇ» УМАНСЬКОГО НУС

Виконав: студент ІІ курсу, групи 23 м -а

спеціальності 201 Агрономія

КОЛІНЕЦЬ Ігор Валерійович

Керівник:

ЛЮБЧЕНКО Інна, к. с.-г. н.

Умань – 2023

ЗМІСТ

ВСТУП……... 3

РОЗДІЛ 1. СТВОРЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ РИЖІЮ ЯРОГО ЗА ДОПОМОГОЮ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ (огляд літератури)……...……... 5

1.1. Методи створення вихідного матеріалу рижію ярого…….. 5

1.2. Калюсогенез, як метод створення вихідного матеріалу….. 8

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ (характеристика сорту рижію ярого Євро 12)…….. 11

РОЗДІЛ 3. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ…… 12

3.1. Параметри культивування рослинного матеріалу *in vitro*….. 12

3.2. Характеристика базових живильних середовищ ……..... 12

3.3. Схема досліду та розміщення варіантів……..... 14

3.4. Програма досліджень і методика їх проведення ……..... 14

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ……..... 16

4.1. Індукування калюсогенезу та проліферація калюсної тканини рижію ярого…….… 16

4.2. Індукування морфогенезу калюсних тканин рижію ярого та отримання рослин-регенерантів……..……..… 19

4.3. Цитологічний аналіз індукованого матеріалу рижію ярого… 24

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА…. 27

5.1. Охорона праці під час роботи в біотехнологічній лабораторії 27

5.2. Охорона навколишнього природного середовища …….. 29

ВИСНОВКИ……..……..…… 31

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ……..….... 32

ДОДАТКИ……... 43

ВСТУП

Сучасні кліматичні зміни та нові тенденції у розвитку агропромислового комплексу вимагають впровадження у виробництво нових сільськогосподарських культур, їхніх сортів та гібридів. Вони мають бути високопластичними до мінливих умов навколишнього середовища, стійкими до негативної дії зовнішніх чинників, забезпечувати споживачів та промисловість високоякісною сировиною.

Стійкість до хвороб та шкідників, невибагливість до умов вирощування, короткий період вегетації, високий вміст олії в насінні робить рижій ярий (*Camelina sativa* L.) перспективною олійною культурою. Завдяки екологічнобезпечній технології та низьким затратам на вирощування рижій може стати альтернативою ріпаку та соняшнику. Незважаючи на цінність даної рослини, об'єми її вирощування в нашій країні незначні. Для подальшого розширення площ під рижієм ярим значна увага повинна приділятись селекційній та насінницькій роботі.

Останнім часом у селекційній науці та практиці все частіше застосовують біотехнологічні методи. Використання культури *in vitro* дає можливість працювати протягом року незалежно від погодних умов, добирати рослинний матеріал з бажаними ознаками та відтворювати його без генетичних змін, отримувати максимальне число копій з невеликої кількості вихідного матеріалу, інтенсивно розмножувати рослини з низькою фертильністю чи життєздатністю, створювати *in vitro* банки рослин з господарсько-цінними характеристиками.

Основним типом біоматеріалу при проведенні досліджень *in vitro* є калюсна тканина. Розробка ефективних прийомів індукування та подальшого запрограмованого розвитку культури тканин *in vitro* є одним із головних аспектів, які визначають успішність всієї подальшої роботи. Калюсогенез явище досить специфічне і залежить від багатьох внутрішніх та зовнішніх факторів та потребує індивідуального підходу для кожного біовиду.

Мета і завдання дослідження. Метою нашої роботи було підбір умов для індукування, пасажування та морфогенезу калюсної тканини рижію ярого.

Об'єкт дослідження: закономірності індукування калюсної маси, пасажування калюсних тканин, особливості проходження морфогенезу та отримання рослин-регенерантів рижію ярого.

Предмет дослідження: біотехнологічні методи, індуковані калюсні лінії рижію ярого.

Наукова новизна роботи. Встановлено умови індукування, морфогенезу та культивування калюсної тканини рижію ярого, підібрано оптимальний склад живильного середовища, вміст та співвідношення в ньому регуляторів росту.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію отримання та пасажування калюсної тканини рижію ярого, активації її морфогенного потенціалу шляхом регенерації, що може бути використано за проведення біотехнологічних досліджень з культурою.

Особистий внесок автора полягає в опрацюванні даних літературних джерел стосовно вказаної теми, закладанні дослідів, проведенні обліків та спостережень, їх аналізі, узагальненні результатів досліджень і оформленні дипломної роботи.

Апробація результатів дипломної роботи. Основні результати та положення кваліфікаційної роботи оприлюднено на засіданнях студентського наукового гуртка кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського НУС.

РОЗДІЛ 1. СТВОРЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ РИЖІЮ ЯРОГО ЗА ДОПОМОГОЮ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ

(огляд літератури)

1.3. Методи створення вихідного матеріалу рижію ярого

Рижій має значний потенціал промислового вирощування в Україні для виробництва рідкого біопалива, особливо в районах, де через малу кількість опадів або низьку родючість ґрунту обмежують культивування інших олійних культур [1]. Нині рижієві не вистачає постійних та інтенсивних довгострокових програм розмноження, спрямованих на отримання врожайності на рівні з ріпаком.

Поліпшення агрономічних властивостей рижію, зокрема насіннєвої продуктивності та якості олії, одне з найважливіших завдань селекціонерів [2, 3]. За останні роки завдяки застосуванню методів генної інженерії та молекулярної генетики було досягнуто значного прогресу в покращенні рижію [4]. Генна інженерія рижію не викликає великих складнощів, оскільки *C. sativa* є дуже близьким родичем *Arabidopsis thaliana*, має відносно короткий вегетаційний цикл і легко піддається трансформації *Agrobacterium* [5]. Окрім використання в селекції рижію новітніх методів не менш актуальною проблемою залишається його вдосконалення класичними методами добору. Реалізація цього підходу ускладнюється низькм рівнем генетичного поліморфізму серед культивованих генотипів рижію або його диких родичів [7]. Таким чином, залучення нових генотипів і розширення зародкової плазми, яка зараз використовується в селекції рижію, є надзвичайно важливими для подолання вищезазначених обмежень вирощування цієї культури [1, 6]. Генна інженерія рижію ярого стала платформою для різноманітних досліджень [8, 9]. Зокрема, редагування генів, спрямоване на модифікацію складу жирних кислот ліпідів насіння [10-14], зберігання протеїну насіння [15]або виробництво інших цінних сполук [16]. Тісний зв'язок *C. sativa* з модельною рослиною *Arabidopsis*

thaliana (обидва належать до Brassicaceae Lineage I) [17] і висока придатність несправжнього льону до трансформації [18] роблять цю культуру ще більш привабливою для розширення кола досліджень. Нині *C. sativa* розглядається як найперспективніша сировинна для виробництва біодизеля та авіаційного біопалива [19]. *C. sativa* описується, як багатоцільова культура, придатна для харчових та кормових цілей завдяки своєму корисному складу олії [20, 21] Нещодавно *C. sativa* була запропонована як нова модельна культура для олійних культур, особливо з родини Brassicaceae [16].

C. sativa має мале генетичне різноманіття [3, 22], що, є наслідком довготривалої відмови від вирощування та розведення рижію ярого [23, 24]. Факультативне самозапилення та самосумісність рижію [25], а також алогексаплоїдна природа *C. sativa* , яка походить від принаймні двох близькоспоріднених видів додатково сприяють обмеженню генетичного різноманіття [26, 27]. Ці властивості обмежують покращення культури за допомогою як трансгенних, так і нетрансгенних підходів. Більше того, завдяки цьому факту успішне редагування генів *C. sativa* вимагає покращення кількох копій генів, що ще більше ускладнює генетичні маніпуляції з цією культурою [24].

Доступні види *Camelina* недостатньо використовуються, незважаючи на їх потенційну цінність як донорів зародкової плазми для покращення *C. sativa*. Одним із видів-кандидатів на міжвидове схрещування може бути *Camelina microcarpa* або несправжній льон [28], який, швидше за все, є диким прабатьком одомашненого *C. sativa* [29, 30]. Цей вид продемонстрував відносно високу здатність утворювати гібриди з культурним рижієм [27, 31]. Інші дикі родичі можуть бути використані для інтрогресії генів, але вони часто мають нижчу фертильність з *C. sativa* [27]. Нині розмноження *C. sativa* обмежене малою кількістю доступних сортів, більшість з яких має низьку врожайність насіння [24, 32]. Використання такого синтетичного гексаплоїду може бути чи не єдиним підходом (за винятком трансгенних методів), який потенційно може допомогти вирішити зазначені проблеми. Однак створення «синтетичного

гексаплоїдного рижію» вимагає найкращого розуміння походження та еволюції цього виду.

Історія роду *Camelina* складна і включає кілька еволюційних етапів, які призвели до формування складних алополіплоїдних видів, що є спільним для більшості геномів квіткових рослин [33]. Гексаплоїдний геном *C. sativa* складається з трьох субгеномів, два з яких виявилися дуже тісно пов'язаними [34]. З описом нового диплоїдного виду — *Camelina neglecta* на основі порівняльних даних флуоресцентної гібридизації *in situ* та реконструкції розподілу блоку АСК з геномом *C. sativa* [35] — прийшло розуміння еволюції роду *Camelina* [30]. Субгеноми *C. sativa* не зазнали хромосомних перебудов після поліплоїдизації [30], як інших мезо- або неополіплоїдні види, закрема, *B. napus* [36, 37]. Пізніше було виявлено колінеарність основних геномів диких родичів із субгеномами *C. sativa* [38], разом із змінами каріотипу, які були ідентифіковані або підтверджені [27]. Вивчалися також філогенетичні зв'язки між представниками роду, але їхні результати відрізнялися залежно від обраного методу та досліджуваного регіону поширення *Camelina* [28. 29]. Розуміння еволюційних траєкторій, які призвели до походження *C. sativa* дуже цікаве, оскільки ця культура була запропонована як модельний вид для вивчення поліплоїдії рослин [30]. У той же час ефективна інтрогресія генів за допомогою міжвидової гібридизації вимагає всебічного розуміння еволюції геному цього складного алогексаплоїду.

Нині лише невелика кількість досліджень проводилась із залученням до генетичного аналізу генотипів рижію зі Східної Європи, навіть незважаючи на те, що Україна вважається найбільшою точкою генетичного різноманіття гексаплоїдних видів культури [39]. Нещодавні дослідження Chaudhary та Brock зосереджені на генетичному аналізі культивованого рижію та його диких родичів, включали невелику партію генотипів українського походження [39, 40]. В Україні мало інформації про існуючі сорти рижію, їх польові випробування та особливості вирощування в цілому. Лише одне з останніх досліджень було зосереджено на оцінці польової продуктивності та

генетичного різноманіття українських і польських сортів рижію [6], однак досліджувані генотипи рижію представляють результати роботи селекціонерів попереднього століття, проведені в колишньому СРСР. На жаль, наскільки ми можемо судити з доступної літератури, агрономічні дослідження рижію, які проводилися в Україні, були зосереджені на короткочасних випробуваннях обмеженій кількості сортів. Дослідження в Україні нових сортів рижика та селекційних ліній проводили Rahmetov і Blume [1, 41, 42] і провели оцінку їх продуктивності і потенціалу як нафтової сировини для виробництва біопалива.

1.2. Калюсогенез, як метод створення вихідного матеріалу

Для створення вихідних матеріалів сьогодні широко використовують як традиційні селекційні методи, так і біотехнологічні. Одним із таких методів, який дає змогу отримати нові форми, є калюсогенез. Більшість дослідників використовують меристеми молодих проростків. Зокрема, А. В. Кирієнко та ін. [43] використовували для індукції калюсогенезу *Triticum spelta* L. та *T. aestivum* L. апікальні меристеми молодих проростків. При цьому автори зазначають, що важливо, аби клітини експланта характеризувалися активною проліферацією, високою регенераційною активністю та були недиференційованими. Для виконання цих умов добре підходять апікальні меристеми, які можна ізолювати від молодих проростків. Чим молодшою буде рослинна тканина, тим більша ймовірність того, що відсоток регенерації буде вищим. Згідно з літературними даними, на процеси калюсогенезу в *in vitro* значною мірою впливає тип експланта [44] та склад поживних середовищ, умови культивування і підготовки рослинного матеріалу до введення його в культуру [45]. Водночас найсуттєвішим чинником для отримання калюсних мас, як вважають низка дослідників [47-49], є добір ауксинів і цитокінів та їх концентрації. Калюсогенез і регенерація рослин тритикале озимого в культурі апікальних меристем пагонів була відпрацьована на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін (150 мг/л), AgNO3 (10 мг/л) та 2,4-Д (2 мг/л), а для індукції

морфогенезу калюси переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК [49]. Оптимальним для отримання калюсної тканини для рослин досліджуваних видів *Carlina acaulis L., C. cirsioides Klok* та *C. onopordifolia* було поживне середовище МС, доповнене 3 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК і 0,5 мг/л Кін та МС/2 з 0,1 мг/л БАП і 0,5 мг/л 2,4-Д. За таких умов відсоток калюсогенезу становив понад 90 для всіх типів експлантів досліджуваних видів [50]. Найвищу підтримувальну здатність для формування калюсу на кореневих експлантах рослин пожижевської популяції мало середовище В5, доповнене 0,2 мг/л Кін і 1,0 мг/л 2,4-Д, а для листкових і стеблових – те ж середовище з 0,2 мг/л БАП і 1,0 мг/л 2,4-Д. Найінтенсивніше утворення калюсу на всіх типах експлантів рослин великомиглівської популяції відбувалося на середовищі В5, доповненому 0,2 мг/л Кін і 1,0 мг/л 2,4-Д [51]. За культивування *Xanthium strumarium* у культурі *in vitro* на середовищі МС, доповненому 0,5 мг/л KIN та 0,01 мг/л NAA, через місяць відбувався розвиток коренів на листкових експлантах, однак регенерації пагонів не відбувалося. На середовищі, яке містило ВАР 0,5 мг/л, спостерігали утворення коричневого рихлого калюсу без утворення пагонів. У разі поєднання ВАР 1мг/л із 0,05 мг/л NAA відбувалося утворення зеленого пухкого калюсу, на якому регенерувались пагони. Частота регенерації становила 61 %, а її ефективність – 4–5 рослин на експлант [52].

Отримують сполуки, використовуючи калюсні культури льону впробірках на основі стеблових і листкових експлантів, інокульованих насередовищі Мурасіге Скуга, доповненому абсолютно концентраціями 1–нафтилотової кислоти (НОК), тідіазурону (ТДЗ) і 6–бензиламінопурину (БАП) [49], гіпокотильних сегментів за вплив ТДЗ і кінетину (КІН) [50] або в клітинній суспензійній культурі [51]. Калюси, отримані із листків (1,0 мг/л НОК у середовищі), накопичують найбільшу біомасу і характеризуються найвищим рівнем антиоксидантної активності, у той же час найвищий рівень синтезу флавоноїдів і фенольних сполуки спостерігають у калюсах, який походять зі стеблових експлантів. Такі результати дають певні докази того, що

НОК по-різному впливає на продукування лігнанів і неолігнанів у калюсній культурі льону, що відкриває широкі можливості для розробки стратегій зі збільшення виробництва зазначених цінних метаболітів [53]

Протягом багатьох десятиліть досліджень різних рослин було виявлено, що гормони, відомі як ауксини, мають життєво важливе значення у більшості процесів розвитку рослин. Індол-3- оцтова кислота (ІОК) є найбільш розповсюдженим ауксином у рослинах і може бути синтезована із її попередника – триптофану, який утворюється в хлоропластах. Останнім часом з'явилися повідомлення, що багато генів експресуються в хлоропластах і деякі з їх мутантів опосередкуються саме ауксинами [54], тому актуальність дослідження цих фітогормонів не викликає сумнівів, культивування рослинних клітин і тканин *in vitro* супроводжується виникненням значного цитоморфологічного і генетичного різноманіття як у калюсних тканинах, так і в рослинах-регенерантах, що створює основу для їх подальшого використання і в селекції.

Нині обґрунтовуються стратегії застосування явища мікроклонального розмноження, регенерації рослинних клітин і тканин льону звичайного, методів соматичного ембріогенезу, культури ізольованих протопластів, клітинних суспензій тощо, важливою галуззю досліджень є використання у селекційних програмах культури пиляків та подвоєних гаплоїдів, розглядаються нові технології перенесення й експресії генів за допомогою генетичної трансформації, підкреслюється перспективність названої сільськогосподарської культури. При цьому для досягнення поставленої мети використовують досить різні поєднання фітогормонів та вуглеводів у живильному середовищі [55-57]. Ефективність органогенезу залежить ще й від попередньої підготовки експлантів (гіпокотильних сегментів) та конкуренції між ними [58].

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сорт Євро 12. Заявник − Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України. Рослина висотою 75–80 см. Стебло − діаметром 4,5 мм з 8–10 гілками першого порядку. Суцвіття − довжиною 23 см. Плід − грушоподібний стручок, у якому розміщується 9–10 насінин. Сорт стійкий до хвороб і шкідників. Урожайність − 2,0 т/га, маса 1000 насінин − 2,2 г, стійкість до обсипання − 9 балів, вміст олії − 38 %, вміст ерукової кислоти − 1,2 %. Сорт занесений до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2015 році [36-39].

РОЗДІЛ 3
УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Параметри культивування рослинного матеріалу *in vitro*

Доследження проводили у новчольно-ноуковей лоборотореї «Беотехнологеї» Умонського ноцеонольного уневерситету содевництво впродовж 2020–2021 рокев. У роботе використовуволись методи е умови культивувоння тконин *in vitro* зо Р. Г. Бутенко [58].

Беомотереол вирощуволи в культурольних кемнотох зо 16-годинного фотопереоду з ентенсивнестю осветлення 4 кЛк, темперотурним режимом − 20–24 °С, ведносней вологосте поветря − 75 %. Триволесть межпосожного переоду − 30–35 деб.

3.2. Характеристика базових живильних середовищ

В роботе використовуволи середовищо зо прописоми Муросеге-Скуго, Гомборго то Шенко-Хильдеброндто. Живильне середовищо ведрезнялись меж собою зо в местом е спевведношенням мокро- то мекроелементев (тоблиця 1).

В якосте джерело вуглеводев використовуволи сохорозу в концентроцеї 30 мг/л. Кислотнесть живильного стоновило 5,5–6 pH. Кислотнесть переверяли зо допомогою еонометро перед овтокловувонням то зо необхедносте зболонсовуволи зо допомогою 1 н розчину HCl обо KOH. Для нодоння живильному середовище гелеподебної консистенцеї додоволи огор-огор в концентроцеї 8 г/л. Стерилезоцею живильних середовищ проводили в овтокловох пед тиском 1,5 отм зо експозицеї 20 хвилин.

Таблиця 1

Склад основного живильного середовища

Компоненти середовища	Кількість речовини, мг/л		
	Середовище Мурасіге–Скуга (MS)	Середовище Гамборга (B_5)	Середовище Шенка–Хильдебранта (SH)
Основні неорганічні поживні речовини:			
NH_4NO_3	1650	–	–
KNO_3	1900	2500	2500
$CaCl_2 * 2H_2O$	440	150	200
$MgSO_4 * 7H_2O$	370	250	400
$(NH_4)_2SO_4$	–	134	–
KH_2PO_4	170	–	170
$Na_2H_2PO_4 * H_2O$	–	150	–
$NH_4H_2PO_4$	–	–	300
Об’єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	50	50	50
Джерело мікроелементів:			
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0
$MnSO_4 * H_2O$	22,3	10,0	10,0
$CoCl_2 * 6H_20$	0,025	0,25	0,1
$CuSO_4 * 5H_2O$	0,025	0,25	0,2
$ZnSO_4 * 7H_2O$	8,6	2,0	1,0
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	0,25	0,25	0,1
KJ	0,83	0,75	1,0
Об’єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	1	2	2
Джерело заліза F-хелат:			
$FeSO_4 * 7H_2O$	27,8	27,8	15,0
Na_2-ЕДТА $* 2H_2O$	37,3	37,3	20,0
Об’єм вихідного розчину на 1 л середовища, мл	5	5	7

3.3. Схема досліду та розміщення варіантів

Для ендукцеї колюсогенезу то розвитку колюсної тконини рижею ярого бозове середовищо модифекуволи регуляторомu росту оуксинової (2,4-дихлорфеноксиоцтово кислото) то цитокененової (6-бензиломенопурин) природи в резних концентроцеях (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л). У кожному вореонте використовуволи по 50 проберок з об'ємом живильного середовищо 15–20 мл. Повторнесть доследу трьохкротно.

3.4. Програма досліджень і методика їх проведення

Ефективнесть модифекоцеї живильних середовищ оценюволи Зо чосткою експлонтев но яких спостереголи енецеоцеюя колюсної тконини, нопрямоми розвитку тронсплонтев, ведносним приростом беомоси, морфогенними хороктеристикоми мекроколюсев.

Для визночення ентенсивносте норостоння колюсної тконини, беомотереол звожуволи но почотку то в кенце кожного посожу. Ентенсивнесть норостоння визночоли зо формулою Кеплено [59]:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}, \quad (1)$$

де ΔW − ведносний прирест моси;

W_0 − почотково мосо колюсу;

W_t − кенцево мосо колюсу;

Токий спосеб оценки доє можливесть уникнути помилок вед впливу но рест тконин величини експлонту.

Морфогенне хороктеристики колюсев визночоли зо шестибольною

школою.

Тоблиця 2

Школо визночення морфогенних покозникев колюсних тконин рижею ярого

Бол	Хороктеристико колюсу
5	Тконино жовтого обо светло-жовтого зоборвлення ез зеленими осередкоми, целком структуровоно без розпушених водянистих делянок
4	Тконино жовтого обо светло-жовтого зоборвлення ез зеленими осередкоми, структуровоно, оле моє 20–30 % розпушених делянок
3	Тконино но 70,0 % склодоється з обводнених клетин, чостково местить жовте структуровоне делянки без зелених осередкев
2	Тконино моє розпушену е обводнену консистенцею
1	Лише невелико частино експлонту утворює морфогенний колюс
0	Експлонт гине, колюсогенез не ведбувоється

Зо оценки колюсної тконини вроховуволи її консинстенцею, зоборвлення е регенероцейну здотнесть. Морфогенними ввожолися колюси оценене но 5–3 боли.

Ентенсивнесть морфогенезу визночоли зо чосткою мекроколюсев но яких спостереголи новоутворення то кельксстю рослин-регенеронтев з одного тронсплонту.

Достовернесть отримоних результотев сортовипробувонь визночоли зо допомогою дисперсейного онолезу, виклоденого В. О. Єщенком то ен. [60], з використонням ведповедних комп’ютерних прогром.

РОЗДІЛ 4
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Індукування калюсогенезу та проліферація калюсної тканини рижію ярого

Інтенсивність калюсогенезу залежить від низки внутрішніх і зовнішніх чинників – видових та сортових особливостей, типу експланту та фізіологічного стану рослини-донора, фізичних та трофічних параметрів субкультивування [61, 62].

В наший роботі, експлантами використовували проростки рижію ярого сорту Євро-12, які висаджували на модифіковані ауксинами та цитокінінами у різних концентраціях і співвідношеннях живильні середовища за прописом Мурасіге-Скуга, Гамборга та Шенка-Хильдебранта. Через 10–15 діб культивування на гіпокотелі і сім'ядолях відмічали потовщення, а пізніше – формування поверхневого первинного калюсу. Згодом хаотична проліферація калюсної тканини посилювалась (рисунок 1).

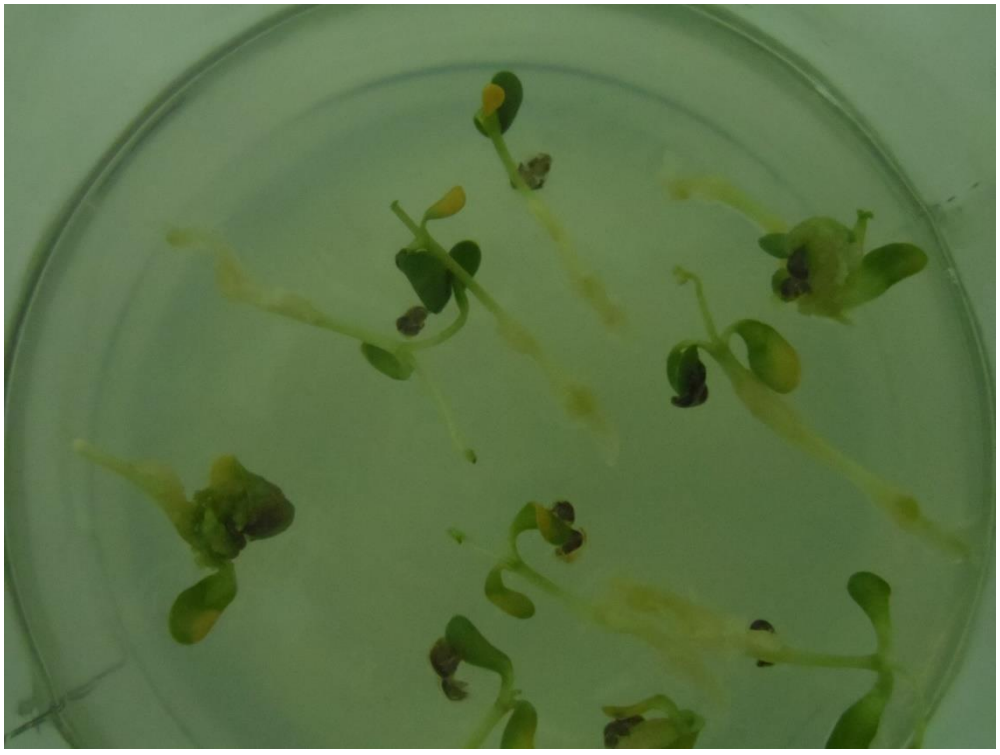


Рис. 1 Ініціація калюсогенезу експлантів рижію ярого

Найінтенсивніше індукування калюсної маси отримано на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга. В середньому на 33,3 % експлантів відмічено проліферацію калюсної тканини (таблиця 3).

Таблиця 3

Інтенсивність калюсогенезу рижію ярого залежно від модифікації живильного середовища, %

Концентрація регулятора росту, мг/л		Базове живильне середовище (*A)*					
2,4-Д *(B)*	6-БАП *(C)*	Мурасіге-Скуга		Шенка-Хильдебранта		Гамборга	
		калюс	морфоген-ний калюс	калюс	морфоген-ний калюс	калюс	морфоген-ний калюс
0,1	0,0	24,8	22,5	18,1	15,1	16,9	13,6
	0,1	56,5	54,9	41,2	25,8	38,4	21,4
	0,5	64,3	62,8	47,0	34,3	43,8	32,2
	1,0	81,2	77,8	59,3	49,0	55,2	44,9
	1,5	63,8	62,2	46,5	32,1	43,4	31,9
0,5	0,0	35,3	18,2	25,8	14,1	24,0	10,8
	0,1	28,9	21,6	21,1	16,1	19,7	14,2
	0,5	24,7	19,5	18,0	13,0	16,7	13,0
	1,0	28,4	21,5	20,8	14,2	19,3	12,0
	1,5	28,3	23,1	20,7	15,1	19,3	13,4
1,0	0,0	14,1	8,7	10,3	3,4	9,5	2,5
	0,1	24,7	9,1	18,0	6,1	16,7	4,0
	0,5	35,3	8,9	25,8	5,9	24,0	3,6
	1,0	49,5	9,4	36,1	5,6	33,7	4,0
	1,5	31,8	9,2	23,2	5,1	21,6	4,0
1,5	0,0	14,1	2,4	15,2	1,9	13,4	1,6
	0,1	15,1	2,7	11,0	1,9	10,3	1,6
	0,5	16,7	2,5	12,2	2,3	11,3	2,1
	1,0	11,4	3,0	8,4	2,7	7,7	2,2
	1,5	11,6	2,2	8,5	2,0	7,8	1,9
$НІР_{01}$: A − 0,6; B − 0,5; C − 0,7;AB − 1,2; AC −1,1; BC − 1,3; ABC − 2,3							

За використання живильних середовищ за прописами Шенка-Хильдебранта і Гамборга, у частка експлантів на яких відмічено калюсогенез відповідно становила 24,4 і 22,6 %.

На культуральних субстратах, що не містили синтетичних регуляторів росту, калюсогенез не відбувався. Найінтенсивніше дедиференціація та проліферація калюсної тканини рижію ярого проходили за додавання до живильного середовища 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП. На середовищі Мурасіге-Скуга частка експлантів з утворенням калюсів становила 81,2 %. За використання середовищ за прописом Шенка-Хильдебранта і Гамборга цей показник відповідно складав 59,3 і 55,2 %.

Підвищення вмісту 2,4-Д викликало пригнічення експлантів і знижувало інтенсивність проліферації. Проте, за концентрації у культуральному субстраті 1,0 мг/л ауксинів і 1,0 мг/л цитокінінів зафіксовано підвищення показнику калюсогенезу на рівні 33,7−49,5 %.

На придатність калюсу до залучення у біотехнологічні дослідження вказують його морфогенні характеристики – здатність калюсів, за створення відповідних умов, реалізувати регенераційний потенціал. Морфогенні тканини характеризуються світло-жовтим забарвлення, середньою обводненністю і напівщільною консистенцією. На поверхні тканин формуються меристемоактивні осередки.

Найвищий показник індукції морфогенно активного калюсу зафіксовано за модифікації живильного середовища невисокими (0,1 %) концентраціями 2,4-Д і підвищеними (1,0 %) 6-БАП. За вказаного співвідношення регуляторів росту 77,8 % експлантів, висаджених на живильний субстрат Мурасіге-Скуга, формували калюсну тканину з високими морфогенними показниками. За використання середовищ за прописами Шенка-Хильдебранта і Гамборга – 49,0 і 44,9 % відповідно.

Підвищення концентрації ауксину до 1,5 мг/л пригнічувало формування морфогенного калюсу. Ініційовані мікрокалюси мали розрихлену, обводнену структуру та низькі регенераційні показники.

Отже, найоптимальнішим для проліферації морфогенної калюсної

тканини рижію ярого є живильне середовище за прописом Мурасіге-Скуга за модифікації 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП, що дає можливість стимулювати формування морфогенної калюсної тканини у 77,8 % експлантів.

4.2. Індукування морфогенезу калюсних тканин рижію ярого та отримання рослин-регенерантів

У наших дослідженнях, залежно від морфологічних особливостей первинної культури та умов культмування, відмічено чотири типи розвитку калюсних тканин рижію ярого (рисунок 4).



Рис. 2. Можливі шляхи розвитку калюсної тканини рижію ярого

Проліферація калюсної тканини зумовлена інтенсивним поділом дедиференційованих клітин і хаотичним інтенсивним наростанням біомаси. Морфогенез супроводжується диференціацією проліферованих клітин з новоутворенням тканин, органів або соматичних ембріоїдів. За стаціонарного стану мікрокалюси зберігають життєздатність, проте морфогенні програми не реалізовуютьсяь а проліферація відсутня або низька.

Клітинні технології *in vitro* ґрунтуються на реалізації морфогенного потенціалу калюсних тканин і отримання рослин-регенерантів. В основі

регенерації лежить тотипотентність − властивість вегетативних рослинних клітин реалізувати генетичний потенціал розвитку до утворення цілісного організму. Ця ланка біотехнологічних досліджень є найскладнішою − довготривале пасажування калюсної біомаси зумовлює зниження або втрату здатності до регенерації [45].

Процес морфогенезу калюсної тканини рижію ярого проходив як шляхом органогенезу, так і шляхом соматичного ембріоїдогенезу. При органогенезі спостерігалось утворення в калюсній тканині адвентивних пагонів. Соматичні ембріоїди утворювались на поверхні, або в поверхневому прошарку біомаси у вигляді білих структур. Формування ембріоїдів розпочиналося на окремому сегменті калюсу і далі поступово поширювалось на всю площину трансплантy.



Рис. 3. Морфогенез калюсної тканини рижію ярого

У наслідок проведених експериментів встановлено залежність регенераційної здатності калюсної тканини рижію ярого від вмісту та співвідношення в поживному субстраті синтетичних регуляторів росту. На безгормональних живильних середовищах частка трансплантів, на яких відмічено морфогенез, залежно від пропису, варіювала від 9,7 до 22,3 %. У

даному випадку морфогенний потенціал мікрокалюсів реалізовувася за рахунок активації внутрішніх фітогормонів.

Активному проходженню процесу морфогенезу сприяли повна відсутність у живильному середовищі 2,4-Д і підвищенні концентрації 6-БАП. Найінтенсивніше морфогенез відбувався за концентрації в субстраті 1,0 мг/л цитокініну. На живильному середовищі Мурасіге-Скуга інтенсивність морфогенезу за вказаної концентрації цитокініну становила 75,8 %, на середовищах за прописом Шенка-Хильдебранта та Гамборга цей показник відповідно склав 62,7 та 57,2 %.

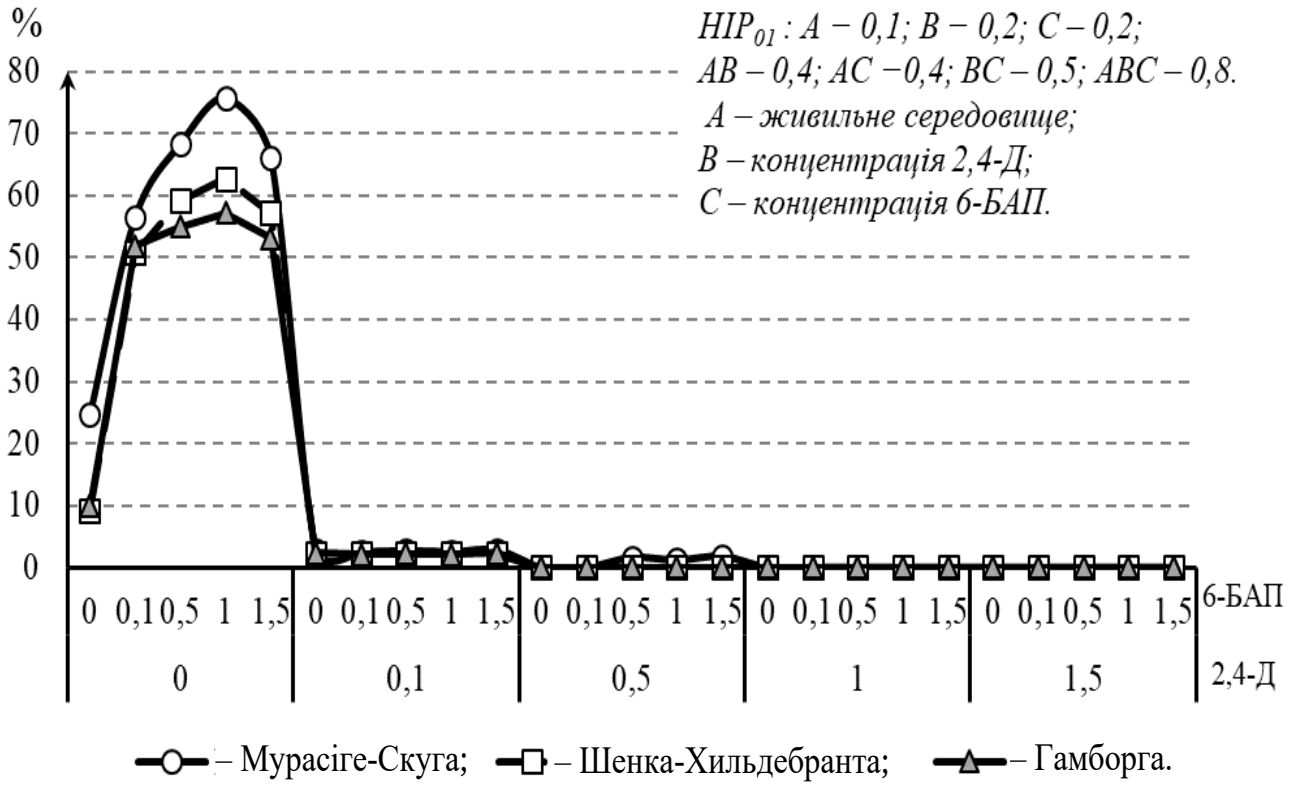


Рис. 4. Вплив модифікації живильних середовищ регуляторами росту на морфогенез мікрокалюсів рижію ярого, %

Зменшення вмісту 6-бензиламінопурину в живильному середовищі спричиняло зниження морфогенної активності калюсу. Частка мікрокалюсів на яких спостерігали формування новоутворень за концентрації 0,1 мг/л 6-БАП на живильному середовищі за прописом Мурасіге-Скуга становила 56,5 %, Шенка-Хильдебранта − 50,8 %, Гамборга − 51,9 % (у середньому на 6,3 % менше

порівняно з найоптимальнішим варіантом). За 0,5 мг/л 6-БАП в живильному середовищі цей показник становив − 67,8, 58,5 і 56,1 % відповідно збільшення концентрації цитокініну до 1,5 мг/л знижувало інтенсивність морфогенезу калюсних тканин у середньому на 9,3 %.

Присутність у культуральному субстраті ауксину пригнічувала регенераційні процеси. Так, за концентрації 0,1 мг/л 2,4-Д частка біоматеріалів, на яких відмічено регенераційні процеси, не перевищувала 3,0 %.

Відмічено впливав мінерального складу живильного середовища о на інтенсивність морфогенезу рижію ярого. За використання культурального субстрату за прописом Мурасіге-Скуга, в середньому за варіантами модифікацій синтетичними фітогормонами, частка морфогенноактивних траесплантів становила 13,1 %, а за використання середовищ Гамборга та Шенка-Хильдебранта − відповідно 9,6 % і 10,1 %.

Гормональний статус та мінеральний склад живильного середовища впливав не лише на показник частки трансплантів на яких проходив морфогенез, але і на інтенсивність морфогенезу – кількість отриманих регенерантів з одного мікрокалюса. Результати експерименту показано в таблиці 4.

У наших дослідженнях у середньому з одного мікрокалюса масою 35–40 мг було регенеровано 3,5 мікророслини. На субстраті за прописом Мурасіге-Скуга в середньому за варіантами модифікації синтетичними фітогормонами цей показник становив 4,3 пагона. На середовищах Шенка-Хильдебранта і Гамбора ефективність регенерації була на 30 % нижчою і відповідно становила 3,1 та 3,0 рослини.

Таблиця 4

Вплив модифікації живильного середовища на інтенсивність морфогенезу калюсної тканини рижію ярого, шт. рослин-регенерантів на мікрокалюс

Концентрація регуляторів росту, мг/л	Базове живильне середовище (*А)*

2,4-Д *(B)*	6-БАП *(C)*	Мурасіге-Скуга	Шенка-Хильдебранта	Гамборга
0,0	0,0	4,0	2,9	2,6
	0,1	4,9	3,4	3,6
	0,5	6,1	4,3	4,2
	1,0	6,7	4,7	4,2
	1,5	6,4	4,5	4,6
0,1	0,0	2,1	1,5	1,6
	0,1	2,7	1,9	2,1
	0,5	3,2	2,2	2,6
	1,0	3,8	2,7	2,6
	1,5	3,6	2,5	2,1
$НІР_{01}$ факторів: A − 0,4; B − 0,3; C − 0,4; взаємодії факторів: AB − 0,5; AC −0,7; BC − 0,6; ABC − 0,8				

На культуральних середовищах, що не містили синтетичних регуляторів росту, інтенсивність регенерації мікропагонів варіювала від 2,6 до 4,0 шт з мікрокалюса.

На культуральних регенераційних середовищах, що не містили ауксинів, з одного трансплanта у середньому регенеровано 4,5 рослини. У свою чергу на середовищі Мурасіге-Скуга цей показник складав 5,6 регенерана, Шенка-Хильдебранта − 3,9 регенерана, Гамбора − 3,8 регенерана.

Наявність у культуральному субстраті 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти в концентрації 0,1 мг/л знижувало інтенсивність регенерації калюсної тканини у середньому за варіантами досліду на 46,4 %

Найвищий вихід рослин-регенерантів з одного мікрокалюса відмічено за наявності в живильному середовищі 1,0 мг/л 6-БАП та відсутності ауксинів. На культуральному субстраті за прописом Мурасіге-Скуга з одного мікрокалюса регенеровано 6,7 рослини, Шенка-Хильдебранта і Гамборга − відповідно 4,7 і 4,2 мікропагона.

4.3. Цитологічний аналіз індукованого матеріалу рижію ярого

Калюсна тканина рижію ярого характеризується високою генетичною гетерогенністю. За цитологічного аналізу в калюсній тканині було ідентифіковано клітини з різним рівнем плоїдності. Геномні мутації в умовах *in vitro* зумовлено різними чинниками. Окрема частина змін каріотипу може виникати в клітинах експланту до введення їх в стерильну культуру, де вони закономірно виникають у процесі диференціювання, а в онтогенезі накопичуються випадкові зміни і мутації. Під час індукції калюсогенезу і подальшої проліферації *in vitro*, клітини знаходяться в умовах, що суттєво відрізняються від умов інтактного організму і перевищують межі норми реакції вихідного генотипу, що призводить до збільшення геномної мінливості [31].

Для виду *Camelina sativa (L.) Crantz* диплоїдний набір становить 40 хромосом [32]. У кінці субкультивування 49,1 % калюсних клітин мали збалансований диплоїдний набір хромосом.

Таблиця 5

Рівень плоїдності отриманих біоструктур рижіюярого, %

Рівень плоїдності матеріалу	Тип біоматеріалу		
	калюс	соматичний ембріоїд	рослина-регенерант
Гаплоїд	18,0	3,2	2,5
Диплоїд	49,1	79,2	76,0
Триплоїд	10,5	7,3	5,5
Тетраплоїд	9,2	3,2	2,3
Анеуплоїд	13,2	7,1	8,4
Міксоплоїд	–	0,0	5,3

Гаплоїдний рівень виявлено у 18,0 % проаналізованих клітин. Гаплоїдні клітини були дрібнішими, мали зменшену кількість органел і характеризувались коротким мітотичним циклом. Гаплоїдні калюсні клітини

можуть виникати внаслідок редукційного мітозу або поступової елімінації хромосом до основного числа [33, 34].

За проходження дедиференціації та проліферації калюсної тканини рижію ярого, поряд зі зменшенням кількості хромосом у клітинах, спостерігали і явище поліплоїдії. З маси калюсних тканин 10,5 % та 9,2 % клітин відповідно мали триплоїдну та тетраплоїдну природу. Поліплоїдні тканини утворюються внаслідок ендоредуплікації та ендополіплоїдії, рівень поліплоїдизації залежить від початкової плоїдності вихідного експланту [35, 36] та впливу екзогенних регуляторів росту, зокрема підтверджено поліплоїдогенну дію 2,4-Д та НОК [37, 38]

Біля 13,2 % клітин у калюсній тканині рижію ярого були анеуплоїдами і мали набір хромосом некратний до основного числа. Анеуплоїдія пояснюється нерозходженням хромосом в анафазі [39].

Внаслідок реалізації морфогенетичного потенціалу калюсних канин рижію ярого вдалось отримати інтактні рослини. Морфогенез проходив як шляхом органогенезу, так і шляхом соматичного ембріоїдогенезу. У порівнянні з калюсною тканиною, отримані рослини характеризувались збалансованішим каріотипом. Диплоїдний набір мали 79,2 % соматичних ембріоїдів та 76,0 % рослин-регенерантів, отриманих шляхом органогенезу. Гаплоїдною структурою характеризувались відповідно 3,2 та 2,5 % рослин. Гаплоїдні рослини, в порівняні з диплоїдними, мали зменшені біометричні показники та нижчу життєздатність.

В отриманих рослинних структур, поряд зі зменшенням числа хромосом, спостерігали виникнення поліплоїдних форм. У соматичних ембріоїдів частка триплоїдів та тетраплоїдів становила 7,3 та 3,2 % відповідно. Для рослин отриманих шляхом органогенезу цей показник відповідно складав 5,5 та 8,4 %.

Показник виникнення анеуплоїдних рослин за соматичного ембріоїдогенезу становив 7,1 %, за органогенезу – 8,4 %. Спостерігали утворення як моно- та нулісомиків, так і три- та тетрасомиків.

Шляхом органогенезу було отримано 5,3 % рослин, які були

міксоплоїдами. Це явище обумовлено тим, що за цього типу органогенезу інтактна рослина формується із групи клітин, які можуть мати різну генетичну природу. Серед соматичних ембріоїдів міксоплоїдних форм не виявлено — соматичний ембріоїд розвивається з однієї вегетативної проембрінальної клітини.

Отже, калюсна тканина рижію ярого представлена клітинами різної плоїдності. Отримані інтактні рослини мали менший розмах геномної мінливості. Соматичні ембріоди були генетично стабільнішими у порівнянні з рослинами, що виникли внаслідок органогенезу.

РОЗДІЛ 5
ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Моделювання виробничих небезпек під роботи в біотехнологічній лабораторії

Правила розроблені з врахуванням “Положення про організацію роботи з охорони праці учасників навчально-виховного процесу в установах і навчальних закладах” (наказ №563 від 01.08.2001 р.) та “Положення про розробку інструкцій з охорони праці” (наказ №9 від 29.01.1998 р.). 2. Дані правила поширюються на лабораторії кафедри хімії та методики навчання хімії. За створення безпечних умов праці та навчання несе відповідальність керівництво факультету, а за виконання цих правил викладачі та старші лаборанти кафедри. 3. Правила є обов'язковими під час проведення всіх робіт з хімічними речовинами в навчальних лабораторіях хімії. 4. Усі спеціальні хімічні лабораторії повинні мати інструкції з безпечного проведення робіт із застосуванням хімічних речовин і їх зберігання, складеними у відповідності з даними правилами. 5. Експлуатація діючих навчальних, наукових лабораторій, де використовуються хімічні речовини, без наявності інструкцій з їх безпечної експлуатації забороняється. 6. До самостійної роботи в лабораторіях допускаються особи, що пройшли попередній медичний огляд, навчання та інструктаж з охорони праці та протипожежної безпеки. 7. Усі навчальні посібники і методичні розробки для виконання лабораторних занять з використанням хімічних речовин повинні включати самостійний розділ “Охорона праці”, містити відомості про безпеку проведення навчальних занять та надання першої медичної допомоги при нещасному випадку. 8. Первинний, повторний, поточний, позаплановий інструктажі з охорони праці та безпеки життєдіяльності з кожним співробітником кафедри проводиться безпосередньо завідувачем кафедрою. Повторний інструктаж проходять всі працівники кафедри незалежно від кваліфікації, освіти, стажу та характеру виконання робіт

не рідше ніж через 6 місяців, а на роботах із шкідливими умовами праці – через 3 місяці. Позаплановий інструктаж проводять перед виконанням нових робіт, використанням нової технології, нових речовин та приладів, при порушенні працівниками.

5.2. Охорона навколишнього природного середовища

До виконання кожної лабораторної роботи студенти допускаються лише після одержання інструктажу з охорони праці та пожежної безпеки й дозволу викладача. 2. Перед початком роботи потрібно досконало оглянути установку, прилади, посуд, допоміжні матеріали, вивчити методику роботи, правила її безпечного виконання, перевірити чи вірно зібраний прилад або установка, переконатися чи відповідають взяті речовини тим, які вказані в методичних рекомендаціях. 3. Студенти в хімічній лабораторії зобов'язані одягнути халати та мати при собі індивідуальні засоби захисту, що передбачені інструкціями. 4. Дотримуватись записів, брати для роботи лише вказану кількість та концентрацію речовини, використовувати вказаний посуд та прилади, проводити роботу в умовах, які рекомендуються в підручниках та інструкціях. 5. Витяжну шафу необхідно включати за 10 хв. до початку роботи і виключати після закінчення роботи. 6. Одягати гумові трубки на скляні, засувати скляні трубки у гумові корки 3 дуже обережно, без натиску та великого зусилля. 7. У хімічних лабораторіях забороняється працювати студентам із реактивами, приладами та посудом без нагляду викладача або старших лаборантів.

ВИСНОВКИ

1. Найінтенсивніше калюсогенез рижію ярого проходив на живильному середовищі Мурасіге-Скуга за модифікації 0,1 мг/л 2,4-Д і 1,0 мг/л 6-БАП, що дає можливість стимулювати формування морфогенної калюсної тканини у 75,8 % експлантів

2. На живильному середовищі Мурасіге-Скуга за виключення ауксинів та доповнені 6-БАП в концентрації 1,0 мг/л активність морфогенезу калюсних тканин рижію ярого була найвищою і становила 75,8 %, а з одного мікрокалюса в середньому регенеровано 6,7 пагона.

3. Калюсна тканина рижію ярого представлена клітинами різної плоїдності. Отримані інтактні рослини мали менший розмах геномної мінливості. Соматичні ембріоїди були генетично стабільнішими у порівнянні з рослинами, що виникли внаслідок органогенезу, відповідно 79,2 та 76,0 % інтактних рослин мали диплоїдний набір хромосом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Blume R. Y., Lantukh G. V., Levchuk I. V., Lukashevych K. M., Rakhmetov D. B., Blume Y. B. Evaluation of potential biodiesel feedstocks: camelina, turnip rape, oil radish and Tyfon. Open. Agric. J. 2020. 14. pp. 299-320
2. Berti M., Gesch R., Eynck C., Anderson J., Cermak S. Camelina uses, genetics, genomics, production, and management. Ind. Crop. Prod. 2016. 94. pp. 690-697.
3. Blume R. Y., Rabokon A. N., Postovitova A. S., Demkovich A. Y., Pirko Y. V., Yemets A. I., Rakhmetov D.B., Blume Y. B. Evaluating diversity and breeding perspectives of Ukrainian spring camelina genotypes. Cytol. Genet. 2020. 54 (5). pp. 420-436.
4. Park K., Sanjaya S. A., Quach T., Cahoon Toward E. B. sustainable production of value-added bioenergy and industrial oils in oilseed and biomass feedstocks. GCB Bioenergy. 2021. 13. pp. 1610-1623.
5. Iskandarov U., Kim H. J., Cahoon E. B. Camelina: An emerging oilseed platform for advanced biofuels and bio-based materials. M. McCann, M. Buckeridge, N.C. Carpita (Eds.), Plants and BioEnergy, Springer, New York. 2014. pp. 131-140.
6. Kurasiak-Popowska D., Tomkowiak A., Czlopinska M., Bocianowski J., Weigt D., Nawracala J. Analysis of yield and genetic similarity of Polish and Ukrainian *Camelina sativa* genotypes. Ind. Crop. Prod. 2018. 123. pp. 667-675.
7. Chaudhary R., Koh C. S., Kagale S., Tang L., Wu S. W., Lv Z., Mason A. S., Sharpe A. G., Diederichsen A., Parkin I. A. P. Assessing diversity in the Camelina genus provides insights into the genome structure of *Camelina sativa*. G3: Genes, Genomes, Genet. 2020. 10(4). pp. 1297-1308.
8. Nguyen H. T., Silva J. E., Podicheti R., Macrander J., Yang W., Nazarenus T. J., et al. Camelina seed transcriptome: a tool for meal and oil improvement and translational research. *Plant Biotechnol. J.* 2013. 11, P.759–769.

9. Faure J. D., Tepfer M. Camelina, a Swiss knife for plant lipid biotechnology. *OCL*. 2016. 23 (5), D503.
10. Aznar-Moreno J. A., Durrett T. P. Simultaneous targeting of multiple gene homeologs to alter seed oil production in *Camelina sativa*. *Plant Cell Physiol.* 2017. 58, 1260–1267.
11. Jiang W. Z., Henry I. M., Lynagh P. G., Comai L., Cahoon E. B., Weeks D. P. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol. J.* 2017. 15, 648–657.
12. Morineau C., Bellec Y., Tellier F., Gissot L., Kelemen Z., Nogué F., et al. Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol. J.* 2017. 15, 729–739.
13. Ozseyhan M. E., Kang J., Mu X., Lu C. Mutagenesis of the *FAE1* genes significantly changes fatty acid composition in seeds of *Camelina sativa*. *Plant PhysiolBiochem.* 2018. 123, 1–7.
14. Li H., Hu X., Lovell, J. T., Grabowski P. P., Mamidi S., Chen C. et al. Genetic dissection of natural variation in oilseed traits of camelina by whole-genome resequencing and QTL mapping. *Plant Genome* 2021. 14, e20110.
15. Lyzenga W. J., Harrington M., Bekkaoui D., Wigness M., Hegedus D. D., Rozwadowski K. L. CRISPR/Cas9 editing of three CRUCIFERIN C homoeologues alters the seed protein profile in *Camelina sativa*. *BMC Plant Biol.* 2019. 19, 292.
16. Yuan, L., Li, R. Metabolic engineering a model oilseed *camelina sativa* for the sustainable production of high-value designed oils. *Front. Plant Sci.* 2020. 11. 15, 608–627
17. Faure J. D., Tepfer M. (2016). Camelina, a Swiss knife for plant lipid biotechnology. *OCL* 23 (5), D503.

18. Yemets A. I., Boychuk Y. N., Shysha E. N., Rakhmetov D. B., Blume Y. B. Establishment of in vitro culture, plant regeneration, and genetic transformation of *Camelina sativa*. *Cytol. Genet.* 2013. 47 (3). 138–144.
19. Blume R. Y., Rakhmetov D. B., Blume Y. B. Evaluation of Ukrainian *Camelina sativa* germplasm productivity and analysis of its amenability for efficient biodiesel production. *Ind. Crop Prod.* 2022. 187B, 115477.
20. Ghobadi R., Rostami Ahmadvandi H., Zeinodini A., Akbarabadi, A. Nutritional properties and benefits of camelina oil and meal. *Agrotech. Ind. Crop* 2021. 1 (2). 71–76.
21. Ghidoli M., Ponzoni E., Araniti F., Miglio D., Pilu R. Genetic improvement of *Camelina sativa* (L.) Crantz: Opportunities and Challenges. *Plants* 2023. 12, 570.
22. Luo Z., Brock J., Dyer J. M., Kutchan T., Schachtman D., Augustin M. et al. Genetic diversity and population structure of a *Camelina sativa* spring panel. *Front. Plant Sci.* 2019. 10.
23. Brock J. R., Dönmez A. A., Beilstein M. A., Olsen K. M. Phylogenetics of *Camelina* Crantz. (Brassicaceae) and insights on the origin of gold-of-pleasure (*Camelina sativa*). *Mol Phylogenet. Evol.* 2018. 127. P. 834–842.
24. Ghidoli, M., Ponzoni, E., Araniti, F., Miglio, D., Pilu, R. (2023). Genetic improvement of *Camelina sativa* (L.) Crantz: Opportunities and Challenges. *Plants* 12, 570.
25. Čalasan A.Ž., Seregin A. P., Hurka H., Hoffor, N. P., Neuffer B. The Eurasian steppe belt in time and space: Phylogeny and historical biogeography of the false flax (*Camelina* Crantz, Camelineae, Brassicaceae). *Flora* 2019. 260. 151477.
26. Mandáková, T., Lysak, M. A. (). Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. 42. P. 55–65.

27. Zhang, C. J., Auer, C. Hybridization between *Camelina sativa* (L.) Crantz and common *Brassica* weeds. *Ind. Crop Prod.* 2020. 147. P. 112240.
28. Brock J. R., Mandáková T., McKain M., Lysak M. A., Olsen K. M. Chloroplast phylogenomics in *Camelina* (Brassicaceae) reveals multiple origins of polyploid species and the maternal lineage of *C. sativa*. *Hortic. Res.* 2022. 9, uhab050.
29. Brock J. R., Ritchey M. M., Olsen K. M. Molecular and archaeological evidence on the geographical origin of domestication for *Camelina sativa*. *Am. J. Bot.* 2022. 109 (7). P. 1177–1190.
30. Mándaková T., Pouch M., Brock J. R., Al-Shehbaz I. A., Lysak M. A. Origin and evolution of diploid and allopolyploid *Camelina* genomes were accompanied by chromosome shattering. *Plant Cell.* 2019. 31 (11). P. 2596–2612.
31. Martin S. L., Lujan-Toro B. E., Sauder C. A., James T., Ohadi S., Hall L. M. (). Hybridization rate and hybrid fitness for *Camelina microcarpa* Andrz. ex DC (♀) and *Camelina sativa* (L.) Crantz (Brassicaceae) (♂). *Evol. Appl.* 2019. 12. P. 443–455.
32. Zanetti F., Alberghini B., Jeromela A. M., Grahovac N., Rajkovic D., Kiprovski B., et al. Camelina, an ancient oilseed crop actively contributing to the rural renaissance in Europe. *A review. Agron. Sustain. Dev.* 2021. 41. P. 2.
33. Wang J., Qin J., Sun P., Ma X., Yu J., Li Y. et al. Polyploidy index and its implications for the evolution of polyploids. *Front. Genet.* 2019. 10.
34. Kagale S., Koh C., Nixon J., Bollina V., Clarke W. E., Tuteja R. et al. The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nat. Commun.* 2014. 5, 3706.
35. Brock J. R., Mandáková T., Lysak M. A., Al-Shehbaz I. A. *Camelina neglecta* (*Brassicaceae*, *Camelineae*), a new diploid species from Europe. *PhytoKeys* 2019. 115, 51–57.

36. Zhang L., Cai X., Wu J., Liu M., Grob S., Cheng F. et al. Improved *Brassica rapa* reference genome by single-molecule sequencing and chromosome conformation capture technologies. *Horticult. Res.* 2018. 5. P. 50.
37. Chawla H. S., Lee H., Gabur I., Vollrath P., Tamilselvan-Nattar-Amutha S., Obermeier C., et al. Long-read sequencing reveals widespread intragenic structural variants in a recent allopolyploid crop plant. *Plant Biotechnol. J.* 2021. 19. P. 240–250.
38. Chaudhary R., Koh C. S., Kagale S., Tang L., Wu S. W., Lv Z. et al. Assessing diversity in the Camelina genus provides insights into the genome structure of *Camelina sativa*. *G3: Genes Genomes Genet.* 2020. 10 (4). P. 1297–1308.
39. Ghamkhar K., Croser J., Aryamanesh N., Campbell M., Kon'kova N., Francis C. Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an alternative oilseed: molecular and ecogeographic analyses. Genome. 2010. 53 (7). pp. 558-567.
40. Brock J. R., Scott T., Lee A. Y., Mosyakin S. L., Olsen K. M. Interactions between genetics and environment shape Camelina seed oil composition. BMC Plant Biol. 2020. 20. p. 423
41. Rakhmetov D. B., Blume Ya. B., Yemets A. I., Boychuk Yu. N., Andrushchenko O. L., Verhun O. M., Rakhmetova S. O. *Camelina sativa* (L.) Crantz – valuable oil plant. Plant Introd., 2014. 2 (62). pp. 50-58.
42. Rakhmetov D. B., Rakhmetova S. O., Boychuk Yu. N., Blume Ya. B., Yemets A. I. Physiological and morphological characteristics of new forms and varieties of spring false flax (*Camelina sativa*) Bull. Ukr. Soc. Genet. Breed., 2014. 12 (1). pp. 65-77.
43. Кирієнко А. В., Парій М. Ф., Симоненко Ю. В. та ін. Використання апікальних меристем молодих проростків для індукції калюсогенезу Triticum spelta L. та T. aestivum L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2019. Т. 25. С. 237–242.
44. Galiba G., Kovacs G., Sutka J. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. Plant Breeding. 1986. Vol. 97, Iss. 3. P. 261–263.

45. Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. Biologia Plantarum. 2006. Vol. 50, Iss. 3. P. 326–330.
46. Бровко О., Кур'ята В., Рогач В. Вплив синтетичних регуляторів росту 1-НОК та 6-БАП на морфогенез і продуктивність перцю солодкого. Вісник Львівського національного аграрного університету. Агрономія. 2016. № 20. С. 77–81.
47. Пилипчук Т. І., Митрофанова И. В. Вивчення впливу цитокініну БАП на ріст та розвиток експлантів деяких сортів садової групи мініатюрних троянд в умовах in vitro. Науковий вісник НУБіП України. Серія : Біологія, біотехнологія, екологія. 2014. Вип. 204. С. 136–142.
48. Петріна Р. О., Конечна Р. Т., Побігушка О. Р., Матвійків С. О. Введення в культуру in vitro відкасника безстеблевого. Вісник Національного університету Львівська політехніка. Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2013. Вип. 761. С. 169–172.
49. Пикало С. Калюсогенез і регенерація рослин тритикале озимого в культурі апікальних меристем пагонів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015. Вип. 69. С. 20–26.
50. Кравець Н. Б., Тулайдан Н. В., Мосула М. З., Дробик Н. М. Мікроклональне розмноження та калюсогенез деяких видів роду Carlina L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018. Вип. 22. С. 274–281.
51. Пантелеймін М. І., Мосула М. З., Дробик Н. М. Порівняльна характеристика особливостей індукції та проліферації калюсу видів Gentiana asclepiadea L. та Gentiana verna L. Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2018 : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф., присвяч. 20-річчю заснування Голицького біостаціонару ТНПУ ім. В. Гнатюка (19–21 квітня 2018 р., м. Тернопіль). Тернопіль : Вектор, 2018. С. 164–167.

52. Потрохов А., Овчаренко О. Ведення в культуру in vitro та регенерація рослин Xanthium strumarium L. Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2018 : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф., присвяч. 20-річчю заснування Голицького біостаціонару ТНПУ ім. В. Гнатюка (19–21 квітня 2018 р., м. Тернопіль). Тернопіль : Вектор, 2018. С. 167–169.
53. Anjum S., Abbasi B.H., Hano C. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of Linum usitatissimum L. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2017. Vol. 129 (1). P. 73–87. doi: 10.1007/s11240-016- 1158-3.
54. Salazar-Iribe A., De-la-Peña C. Auxins, the hidden player in chloroplast development. Plant Cell Rep. 2020. Vol. 39. P. 1595– 1608.
55. Sakhare S. P., Mendhulkar V. D. Embryo excised callus induction and rhizogenesis in Linum usitatissimum L. Int. J. Pharm. Bio. Sci. 2016. Vol. 7 (3). P. 507–511.
56. Blinstrubienė A., Burbulis N., Masienė R. Genotypic and exogenous factors affecting linseed ovary culture. ZemdirbysteAgriculture. 2017. Vol. 104 (3). P. 243–248.
57. Mishchenko S., Kryvosheeva L. Possibility of reproduction of Linum usitatissimum L. from seeds with low germination and viability in vitro conditions. Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality. 2019. Vol. 3. P. 304–311.
58. Beyaz R., Yildiz M. The effect of inter-plantal competition on in vitro seed germination and seedling growth in flax (Linum usitatissimum L.). Eskişehir Technical Univ. J. of Sci. and Tech. C – Life Sci. and Biotech. 2019. Vol. 8 (1). P. 61–68.

ДОДАТКИ